

## EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN DE TERMITIERES, PRESENCE D'ADN BACTERIEN

**HARRY M., JUSSEAUME N., GAMBIER B. et GARNIER-SILLAM E.**

*Laboratoire de Biologie des Sols et des Eaux,  
Université Paris XII-Val de Marne  
61, av. du Général de Gaulle, 94 000 Créteil, France*

**Résumé.** De nombreuses études ont montré que dans les écosystèmes tropicaux, les termites contribuent de façon significative aux différents processus de dégradation de la matière organique et modifient les propriétés physiques et chimiques des sols. En revanche, leur action sur les micro-organismes du sol a été très peu étudiée. En effet, les méthodes traditionnelles ne permettent la mise en évidence que d'une faible fraction de la biomasse microbienne totale. Avec l'essor des techniques moléculaires, des macromolécules informatives comme l'ADN deviennent accessibles sans qu'il soit nécessaire d'isoler ou de cultiver des cellules bactériennes. Une étape critique de notre travail a été la mise au point d'une méthode efficace d'extraction et de purification d'ADN des termitières, préalable nécessaire à toute étude moléculaire reposant sur l'emploi de la PCR (Polymerase Chain Reaction). En effet, les propriétés physiques et chimiques des termitières notamment d'humivores, à savoir une texture argileuse et de forts taux en matières organiques et en acides humiques, sont très défavorables à un bon rendement d'extraction et de purification d'ADN. Différentes constructions d'espèces de termites de régimes trophiques différents (espèces humivores : *Cubitermes subarquatus*, *Thoracotermes macrothorax*, *Noditermes lamanianus*, *Procupitermes niapuanensis*, espèce champignoniste : *Odontotermes* sp.) ont été soumises à l'analyse. La quantité d'ADN extrait des termitières d'humivores est significativement plus importante que celle extraite des sols témoins. L'utilisation de la PCR a permis de mettre en évidence la présence d'ADN bactérien au sein de toutes les constructions.

**Mots clés.** Termitières, humivores, champignonistes, ADN, bactéries, PCR

**Abstract.** In tropical ecosystems, termite activities induce changes in the chemical and physical properties of soils. The question then arises as to whether or not termites affect the presence of natural microbial communities. Several reports have pointed out the difficulty of recovering bacteria from natural environments by traditional methods of cell cultivation, only a small fraction of the total microbial biomass being cultivable. With the advances in molecular technologies, informative macromolecules like DNA become accessible without requiring any prior cell isolation or cultivation. A critical step was to develop an efficient method for extracting and purifying DNA from termite mounds, a prerequisite for any molecular study using PCR (Polymerase Chain Reaction). In fact, chemical and physical properties of the termite mounds especially that of soil-feeders (i.e., clay-like texture, high organic carbon and humic acid contents) critically impede good DNA recovery and purification. A diversity of mounds of various trophic group termites (soil-feeders : *Cubitermes subarquatus*, *Thoracotermes macrothorax*,

*Noditermes lamanianus*, *Proculitermes niapuenis*; fungus-growers : *Odontotermes* sp.) was submitted to the analysis. DNA recovery was significantly higher in soil-feeder mounds than in control soils. Using specific amplification (PCR) the presence of bacteria was assessed in all the constructions studied.

**Key words.** Termite mounds, soil-feeders, fungus-growers, DNA, bacteria, PCR

## INTRODUCTION

De nombreuses études ont montré que dans les systèmes tropicaux, les isoptères contribuent de façon significative aux différents processus de dégradation de la matière organique et modifient les propriétés physiques et chimiques des sols (Lee & Wood, 1971 ; Lobry de Bruyn & Conacher, 1990 ; Garnier-Sillam & Harry, 1995). En revanche, leur action sur les micro-organismes du sol a été très peu étudiée. Quelques auteurs ont estimé les populations microbiennes des nids de termitières de champignonnistes à l'aide de méthodes de culture (Meiklejohn, 1965 ; Keya *et al.*, 1982). Mais, ces méthodes traditionnelles ne permettent la mise en évidence que d'une faible fraction de la biomasse microbienne totale, estimée par différents auteurs comme étant de l'ordre de 0,01 à 10 % (Atlas & Barta, 1993). Avec l'essor des techniques moléculaires, des macromolécules informatives comme l'ADN deviennent accessibles sans qu'il soit nécessaire d'isoler ou de cultiver des cellules bactériennes.

Aussi, dans cette étude avons-nous cherché à évaluer l'utilisation de techniques moléculaires reposant sur l'extraction d'ADN, puis sur l'amplification spécifique d'ADN 16S bactérien afin d'attester la présence de bactéries au sein de nids d'espèces de termites ayant des régimes trophiques différents (Harry *et al.*, a soumis).

Notre étude a porté sur les termitières de quatre espèces de termites humivores, *Cubitermes subarquatus*, *Thoracotermes macrothorax*, *Noditermes lamanianus*, *Proculitermes niapuenis*, et d'une espèce champignonniste, *Odontotermes* sp.. Une étape critique a été la mise au point d'une méthode efficace d'extraction et de purification d'ADN des termitières dont les propriétés physiques et chimiques, à savoir une texture argileuse et de forts taux en matières organiques et en acides humiques, sont très défavorables à un bon rendement d'extraction et de purification d'ADN.

## MATERIEL ET METHODES

### Site d'étude et échantillonnage

L'étude s'est déroulée dans le bassin versant élémentaire de Nsimi-Zoetele au Sud-Cameroun. Ce bassin versant appartient au réseau hydrographique du fleuve Nyong dont le cours est situé en forêt tropicale humide entre les latitudes 2°48'N et 4°32'N. L'échantillonnage a été effectué sur les nids de cinq espèces de termites à raison de deux nids par espèce.

*Cubitermes subarquatus*, SJÖSTEDT, érige un nid constitué de "demi-chapeaux" empilés les uns sur les autres et appliqués contre le tronc de grands arbres, qui peut atteindre plus de 2,5 mètres de hauteur. *Thoracotermes macrothorax*, WASMANN,



construit son nid, semble-t-il, avec les mêmes matériaux que *Cubitermes* mais sa muraille est plus épaisse. Le nid, qui ne s'appuie pas à un tronc, présente une forme cylindrique. Sa surface extérieure se montre très régulièrement mamelonnée avec un aspect de pastilles juxtaposées. *Procupitermes niapuenensis*, SILVESTRI, présente un nid plaqué contre le tronc de grands arbres. Il se compose d'une série de constructions en forme de gourdes (4-10 cm), plus ou moins imbriquées les unes dans les autres. De l'ensemble des gourdes partent une ou plusieurs grosses galeries-tunnels qui descendent vers le sol où elles entrent en rapport avec le réseau hypogé de la péricécie. *Noditermes lamanianus*, SJÖSTEDT, érige un nid en forme de pagode. Sa base se compose d'une ou de deux autres surmontées d'une outre plus volumineuse se terminant en cône aigu. Le matériau utilisé est de la terre peu consistante, probablement mêlée à un peu de salive. Les nids se trouvent presque toujours au pied d'un arbre, parfois contre lui.

Ces quatre espèces de termites humivores (Termitinae) consomment de l'humus et incorporent leurs fèces dans leur construction en quantité variable selon les espèces.

*Odontotermes* sp., HOLMGREN, construit un nid s'ouvrant à l'extérieur par un ensemble de cheminées. Les cavités des cheminées se continuent dans la profondeur du nid où elles se ramifient et convergent vers une région située à plus d'un mètre au dessous de la surface du sol. Cette espèce de termite champignoniste (Macrotermitinae) développe une exosymbiose particulière avec un champignon du genre *Termitomyces* pour dégrader le matériel végétal. Le nid est construit avec des particules fines du sol cimentées par de la salive. Les fèces ne sont pas incorporées mais déposées sur les planchers des constructions.

Des sols ne présentant pas d'activité termitique notable au moment du prélèvement ont été désignés comme sols témoins et cinq strates ont été échantillonnées (0-2, 2-5, 5-20, 20-30, 30-40 cm). Souignons, cependant, qu'en Afrique, la notion de sol témoin est relative. En effet, il est peu probable que les sols choisis aient été totalement exempts d'une bioperturbation au cours du temps. Dans notre étude, la strate 2-5 cm est utilisée comme référence des communautés bactériennes du sol.

### **Solsensemencés**

Afin d'évaluer l'efficacité de la méthode d'extraction utilisée, différents sols stériles ont été inoculés par une suspension bactérienne d'*Escherichia coli* (Pharmacia - souche NM 522) de concentration connue. Deux strates du sol témoin (A2 : 2-5 cm; A6 : 100-140 cm) présentant une texture et des taux de carbone organique et d'acides humiques différenciés ont été utilisés.

### **Caractéristiques physiques et chimiques des sols et des termitières**

Pour chaque échantillon (sols et termitières) des analyses pédologiques classiques ont été réalisées notamment, la texture en cinq fractions granulométriques, la teneur en carbone et en azote, et la distribution des substances humiques selon les méthodes décrites dans Garnier-Sillam *et al.*, 1994.

### **Extraction et purification d'ADN**

Deux méthodes principales d'extraction d'ADN du sol ont été décrites. La première méthode décrite par Holben *et al.* (1988) repose sur l'isolement des cellules bactériennes du sol puis sur l'extraction de leur ADN après une étape de lyse cellulaire. La seconde, développée par Ogram *et al.* (1987), repose sur une lyse directe des cellules bactériennes sans isolement préalable des cellules. Différents protocoles d'extraction et

de purification ont été testés afin d'établir un protocole adapté à l'extraction d'ADN de termitière. La qualité de l'ADN extrait est vérifiée après électrophorèse sur gel d'agarose 1% sous U.V. après immersion 10 min dans une solution de Bromure d'Ethidium (1%).

#### *Amplification spécifique d'ADN 16 ribosomique bactérien*

La PCR permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'un segment particulier d'ADN et repose sur l'utilisation de deux amorces, courtes séquences d'ADN (18-24 nucléotides). Ces amorces s'hybrident à des sites complémentaires de l'ADN du génome ciblé qui encadrent la région que l'on veut amplifier. Les conditions d'amplification d'ADN 16S ribosomique bactérien sont décrites dans Harry *et al.* (a soumis). Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### *Caractéristiques physiques et chimiques des sols témoins et des termitières étudiées*

Les principales caractéristiques physiques et chimiques des échantillons étudiés sont reportées dans le tableau 1. On notera que dans les termitières d'humivores les taux de carbone organique sont 2,6 à 4,3 fois plus élevés que ceux relevés dans les termitières de champignonnistes et 2,8 à 1,7 fois plus élevés que ceux des sols témoins. De même, pour les termitières étudiées, les taux d'acides humiques sont plus importants dans les termitières d'humivores que dans celles des champignonnistes.

### *Extraction d'ADN de sols et de termitières*

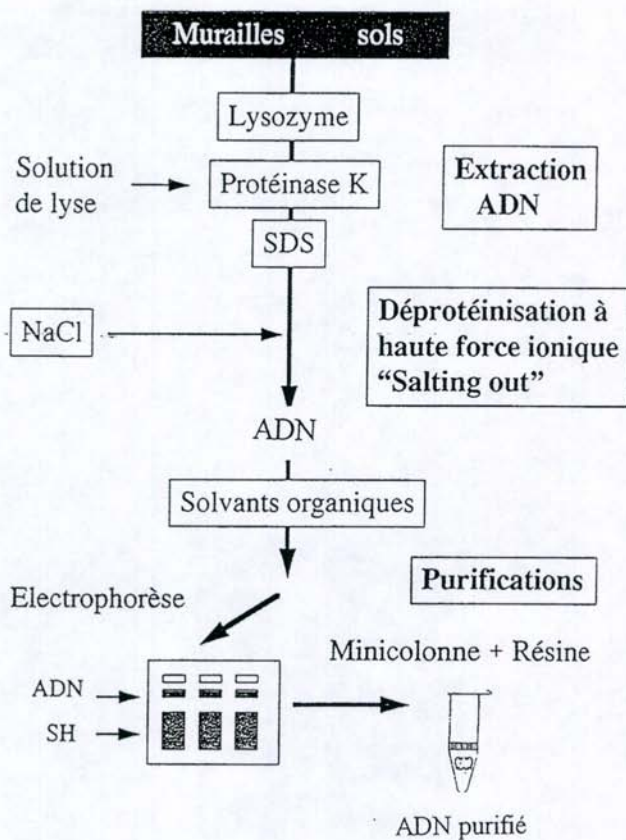
La méthode d'extraction par "lyse directe" a été retenue dans notre étude car elle permet d'obtenir un meilleur rendement d'ADN extrait, celui-ci étant par ailleurs plus représentatif de l'échantillon global. Le protocole général d'extraction est présenté dans la figure 1. Les échantillons de sols et de muraille de termitières sont soumis à une solution de lyse contenant du lysozyme, de la protéinase *k* et du sodium dodecyl sulfate. La précipitation des protéines est réalisée à haute force ionique par ajout de NaCl. Après lavage, l'ADN est précipité à l'éthanol absolu, séché, et repris dans de l'eau ultrapure.

Les protocoles d'extraction incluant l'emploi de billes de verre ou des méthodes de sonication ont été écartés car ils présentent le défaut de fragmenter l'ADN (Ogram *et al.* 1987). L'ADN natif obtenu après extraction, vérifié sur gel d'agarose, n'est pas fragmenté et présente un poids moléculaire supérieur à 23kb. Le rendement d'ADN extrait estimé à partir de l'extraction de sols ensemencés est de 70 à 90% selon la nature du sol. L'ADN du sol A6 plus riche en argile est plus difficile à extraire (Figure 2). Les quantités de l'ADN extrait sont en moyenne de  $13.00 \pm 3.68 \mu\text{g/g}$  de termitière sèche, les termitières de *C. subarquatus* étant les plus riches en ADN ( $17.53 \pm 7.42 \mu\text{g/g}$ ) et celles de *P. niapensis* les moins riches ( $8.67 \pm 3.3 \mu\text{g/g}$ ). Les murailles de termitières d'humivores présentent selon les espèces de 1,5 à 3,5 fois plus d'ADN que les sols témoins et celles des champignonnistes 1,5 fois plus.

### *Purification d'ADN de sols et de termitières*

Lors de la lyse directe, des composés « contaminants », comme les substances humiques et les ions métalliques, sont co-extraits. Ces composés constituent un obstacle majeur à l'utilisation de la PCR car ils inhibent la *Taq* polymérase en chélatant les ions  $\text{Mg}^{2+}$  nécessaires à son fonctionnement ou empêchent l'hybridation des amorces (Tsai & Olson, 1992). De nombreux auteurs se sont heurtés à la difficulté de purification de





*Figure 1 : Protocole d'extraction et de purification d'ADN de sols et de termitières (SDS : Sodium dodecyl sulfate ; SH : Substances humiques)*

*Method used for extracting and purifying DNA from soils and termite mounds.*

Tableau 1 : Caractéristiques physiques et chimiques des sols témoins et des termitières étudiées, COT (Carbone Organique Total), CEC (Capacité d'Echange Cationique), AH (Acides Humiques).

Chemical and physical characteristics of control soils and termite mounds.

	Termitières <i>Odontotermes</i> <i>sp.</i>	Termitières <i>C.</i> <i>subarquatus</i>	Termitières <i>T.</i> <i>macrothorax</i>	Termitières <i>P.</i> <i>niapuensis</i>	Termitières <i>N.</i> <i>lamanius</i>	<i>Sol</i> <i>témoin</i> <i>A2</i> <i>(2-5 cm)</i>	<i>Sol</i> <i>témoin</i> <i>A6 (100-</i> <i>140 cm)</i>
pH eau	4,5 ± 0,0	5,8 ± 0,2	6,00 ± 0,3	6,1	5,4	4,7 ± 0,2	4,8
Argiles (%)	63,1 ± 2,4	61,0 ± 0,5	56,0 ± 1,4	31	70,3	46,9 ± 2,4	67,2
COT	12,5 ± 3,0	44,6 ± 6,5	32,7 ± 1,5	45,1	53,4	18,8 ± 1,2	9,1
NOT	1,4 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,3 ± 0,3	4,21	5,4	1,7	5,76
CEC ( $\text{cmol}^+/\text{kg}$ )	4,6 ± 0,1	12,5 ± 0,1	9,2 ± 1,15	7,5	21,8	5,6 ± 0,5	3,3
AH ( $\text{mgC}/\text{g}$ )	1,8 ± 0,15	6,5 ± 0,9	4,7 ± 0,12	-	-	1,67 ± 0,1	0,41

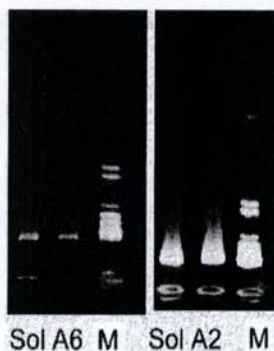


Figure 2 : Electrophorèse sur gel d'agarose : ADN natifs extraits de sols ensemencés (*E. coli*). M= marqueur de taille ( $\lambda$  Hind III digest)

Electrophoresis on agarose gel. Native DNA extracted from seeded soils (*E. coli*). M= Marker ( $\lambda$  Hind III digest)

l'ADN extrait du sol. Trois méthodes principales de purification peuvent être distinguées: les gradients de chlorure de césium, les méthodes électrophorétiques et les méthodes chromatographiques. Les techniques de purification sur gradient de chlorure de césium n'ont pas été retenues dans notre étude car elles sont longues et fastidieuses et ne sont pas toujours suffisantes à elles seules pour obtenir un ADN assez purifié pour être amplifié (Ogram *et al.*, 1987). En revanche, nous avons testé différentes méthodes électrophorétiques et chromatographiques. Il apparaît pour nos échantillons que seule une méthode reposant sur la combinaison d'une purification sur gel d'agarose et d'une purification sur mini-colonne permet l'élimination complète des contaminants (Harry *et al.*, b soumis). Le traitement préalable des échantillons aux solvants organiques facilite les étapes de purification. L'obtention d'une amplification spécifique de la région ribosomique 16S de l'ADN d'*Escherichia coli* (ADNr 16S), lorsque les solsensemencés sont soumis à la réaction de PCR, atteste de l'efficacité de la double méthode de purification utilisée.

#### **Amplification spécifique ADN ribosomique 16S**

La méthode de purification utilisée apparaît d'autant plus efficace que des amplifications bactériennes spécifiques (ADNr 16S) ont été obtenues à partir d'ADN extrait de termitières d'humivores comme celles *C. subarquatus* particulièrement riches en acides humiques. Deux précédentes études avaient déjà souligné les fortes teneurs en acides humiques des termitières d'humivores (Garnier-Sillam *et al.*, 1989; Garnier-Sillam & Harry, 1995). L'obtention d'amplifications spécifiques de la région ribosomique 16S bactérienne dans tous les échantillons soumis à l'analyse atteste la présence de bactéries au sein des murailles de termitières d'humivores et de champignonnistes étudiées (Harry *et al.*, a soumis). La PCR apparaît comme un outil adapté pour détecter la présence de bactéries dans les matériaux très particuliers que constituent les termitières. Si cette technique est utilisée pour la première fois, dans nos études sur de l'ADN extrait de termitières, différentes travaux reposant sur l'emploi de la PCR ont permis l'établissement de phylogénies de bactéries du sol après séquençage de la région de l'ADN ribosomal 16S (Stackebrandt *et al.*, 1993; Borneman & Triplett, 1997). De telles applications constituent la suite de nos études.

## **CONCLUSION**

Une étape critique de notre étude a été la mise au point d'une méthode efficace d'extraction et de purification des ADNs présents au sein de différentes termitières afin d'utiliser des outils moléculaires permettant l'analyse génétique de leurs communautés microbiennes. Les amplifications spécifiques d'ADNr 16S bactérien attestent la présence de bactéries au sein des termitières d'humivores et de champignonnistes étudiées. La plus grande quantité d'ADN observée dans les termitières par rapport aux sols témoins s'explique d'une part, pour les termitières d'humivores par l'incorporation de fèces générant un environnement favorable au développement ou au maintien de micro-organismes, d'autre part pour les termitières de champignonnistes par la présence de carbone facilement dégradable apporté par la salive des termites qui sert de ciment aux constructions. Ces résultats sont à mettre en relation avec les comportements trophiques et constructeurs des termites qui en modifiant les conditions physiques et chimiques de leurs termitières y induisent, par conséquent, des modifications microbiennes.



## REFERENCES

- Atlas, R.M. and R. Bartha, 1993. *Microbial ecology, fundamentals and applications*. Third Edition. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., New York, 21-221.
- Borneman, J. and E.W. Triplett, 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia : evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 2647-2653.
- Garnier-Sillam, E., J. Renoux and F. Toutain, 1989. Les composés humiques des termitières de *Thoracotermes macrothorax* (humivore) et de *Macrotermes mulleri* (champignoniste). *Soil biol. Biochem.* 21 : 499-505.
- Garnier-Sillam, E., C. Decayeux, C. Longuemare, J. M. Bouchy & M. Harry, 1994. Distribution des composés humiques le long de deux profils sédimentaires continentaux. *Annales de Limnologie*, 30, 145-162.
- Garnier-Sillam, E. and M. Harry, 1995. Distribution of humic compounds in mounds of some soil-feeding termite species of tropical rainforests : its influence on soil structure stability. *Ins Soc.* 42 : 167-185.
- Harry, M., B. Gambier and E. Garnier-Sillam (b). How removed humic substances for purifying DNA extracted from soils and termite mounds for polymerase chain reaction applications. *Soumis*
- Harry, M., N. Jusseaume, B. Gambier and E. Garnier-Sillam (a). Molecular analysis of microbial communities in mounds of some tropical soil-feeding and fungus-growing termite species. *Soumis*.
- Holben, W.E., J.K. Jansson, B.K. Chelm and J.M. Tiedje, 1988. DNA Probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 703-711.
- Keya, S.O., N.K. Mureria, and M.A. Arshad, 1982. Population dynamics of soil microorganisms in relation to proximity of termite mounds in Kenya. *J. Arid Environ.* 5 : 353-359.
- Lee, K.E. and T.G. Wood, 1971. Physical and chemical effects on soils of some Australian termites, and their pedological significance. *Pedologia* 2 : 376-409.
- Lobry de Bruyn, L.A., and A.J. Conacher, 1990. The role of termites and ants in soil modification : a review. *Aust. J. Soil Res.* 28 : 55-93.
- Meiklejohn, J., 1965. Microbiological studies on large termite mounds. *Rhod. Zamb. Mal. J. Agric. Res.* 3 : 67-79.
- Ogram A., G.S. Saylor and T. Barclay, 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Meth.* 7 : 57-66.
- Stackebrandt E., W. Liesack and B.M. Goebel, 1993. Bacterial diversity in soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *The FASEB Journal*, 7, 232-236.
- Tsai, Y. and B.H. Olson, 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2292-2295.